Autokit CH50

***In vitro* automatizado basado en liposomas**

Para la determinación de del complemento total en suero humano

HP 995-40801
1008 D1

Uso

El Autokit CH50 es un inmunoensayo *in vitro* automatizado basado en liposomas para la determinación de del complemento total CH50 en suero humano.

Resumen y explicación del ensayo

La cascada del complemento, integrada por aproximadamente 20 proteínas séricas, juega un papel importante en el sistema inmunológico. La actividad del complemento en muestras de suero aporta información importante para el diagnóstico de varias enfermedades. Clínicamente, la actividad del complemento es un indicador directo de las anormalidades del sistema del complemento, a diferencia de los componentes inmunoreactivos del sistema. La actividad del complemento puede ser relacionada con las fases activas del lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, vasculitis-crioglobulinemia, algunas nefritis e inmunodeficiencias congénitas.[1] Hasta el momento, el ensayo más utilizado para el complemento total ha sido el basado en la hemólisis mediada por complemento de hematíes sensibilizados con anticuerpos.[2] En este método, se necesitan diluciones apropiadas del suero para medir las lisis de las células indicadoras. Se ha desarrollado un método sencillo que no requiere diluciones del suero.[3]

Sin embargo, ambos métodos son complicados y laboriosos, y los reactivos son inestables debido a la utilización de hematíes. Además, los sistemas hemolíticos son difícilmente automatizables debido a la inestabilidad de las suspensiones de hematíes. Los liposomas, integrados por láminas concéntricas de bicapas lipídicas separadas por espacios acuosos, han sido ampliamente utilizados en el estudio del daño producido en las membranas celulares por el sistema de complemento.[4,5]

Se había descrito anteriormente un ensayo homogéneo para la actividad total del complemento basado en la inmuno lisis de los liposomas.[6] El grado de lisis, se determinaba a través de la actividad de la fosfatasa alcalina englobada , y el procedimiento, el cual se realizaba de forma manual, no podía aplicarse a los autoanalizadores. Este método requería la adición de varios reactivos a los tubos de reacción, un tiempo de reacción prolongado y la utilización de anticuerpos unidos a los liposomas, lo cual podría provocar la agregación y sedimentación de los liposomas en el reactivo preparado.

Recientemente, hemos desarrollado un ensayo homogéneo automatizable basado en liposomas para la determinación de la actividad de complemento total en suero. Se emplea una población homogénea de liposomas de pequeño tamaño (200 nm), que proporcionan una dispersión estable, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49) como enzima englobada (el pH óptimo de la G6PDH es el neutro a diferencia del de la fosfatasa alcalina. Utilizando estos liposomas, hemos desarrollado un ensayo completamente automático para la determinación de la actividad total del complemento.[7]

Principio del método

Cuando la muestra se mezcla con los liposomas y el substrato, los anticuerpos presentes en el reactivo se combinan con el dinitrofenil (DNP) incorporado a los liposomas. El complejo antígeno-anticuerpo activa el complemento presente en la muestra del paciente. El complemento activado rompe la membrana del liposoma. El enzima, G6PDH contenido en el liposoma, reacciona con el NAD y la glucosa-6- fosfato (G6P) presentes en el reactivo. Durante la reacción enzimática el NAD se reduce a NADH, incrementándose la absorbancia a 340 nm. El incremento de absorbancia es proporcional a la actividad de complemento en la muestra.

Reacción

Reacción enzimática

$$\text{D-Glucosa-6-fosfato + NAD} \xrightarrow{\text{G6PDH}} \text{ß-Gluconolactona-6-fosfato + NADH}$$

(detección a 340 nm)

Reactivos

Contenidos yconditiones de almacenamiento

R1: Liposomas	2 botellas x 20 ml	Conservar a 2-10°C. (No congelar)
R2: Substrato	1 botella x para 20 ml	Conservar a 2-10°C.
R2a: Diluyente	1 botella x 20 ml	Conservar a 2-10°C.
R1: Liposomas	de liposomas conteniendo 4 U/ml	G6PDH
R2: Substrato	Anticuerpo Anti-DNP (cabra)	24 mmol/l G6P 9 mmol/l NAD
R2a: Diluyente	Tampón maleate pH5,5 **Mezcla de:** 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-ona [EC no 247-500-7] y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [EC no 220-239-6] (3:1)	10 mmol/l

Este kit contiene componentes clasificados como sigue de acuerdo con la Directiva Europea 91/ 155/ EEC.

Letra distintiva y denominación de peligro del producto:

Xi

Xi: Irritante

Información relativa a peligros específicos para el ser humano y el medio ambiente.

Frases-R:

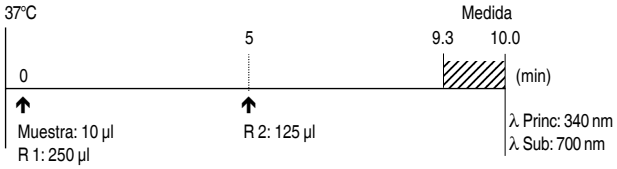
43 Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.

Frases-S:

24 Evítese el contacto con la piel.
37 Úsense guantes adecuados.

Procedimiento

Hitachi®717



Este procedimiento estándar es sólo un ejemplo. Aplicaciones para autoanalizadores están disponibles bajo pedido.

Advertencias y precauciones

- Para diagnóstico *in vitro.*
- Para uso professional.
- No utilizar internamente en personas o animales.
- No mezclar reactivos pertenecientes a kits con números de lote diferentes.
- No emplear reactivos que hayan superado la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de cada envase.
- No emplear los reactivos descritos anteriormente para propósitos diferentes al indicado.
- Concentraciones de ácido ascórbico hasta 50 mg/dl, hemoglobina hasta 500 mg/dl y bilirrubina hasta 40 mg/dl no interfieren de forma significativa con el Autokit CH50.

Advertencia / Riesgo biológico

Dado que todas las muestras son potencialmente infecciosas, deben ser manipuladas en nivel de seguridad 2, tal como se recomienda para cualquier fluido corporal potencialmente infeccioso en el manual „ Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos" del Centro USA para el Control de la Enfermedad / Instituto USA de la Salud, y siguiendo las normativas locales o nacionales relativas a la manipulación de tales materiales.

Indicios de inestabilidad física o química

La presencia de precipitados en los reactivos o la obtención de valores de suero control fuera de lo establecido por el fabricante puede ser una indicación de inestabilidad en el reactivo.

Instrumentación

El reactivo se ha diseñado para su utilización en los analizadores disponibles en el mercado. Consultar el manual de instrucciones para obtener una descripción de su utilización y especificaciones. Las prestaciones obtenidas en equipos alternativos deben ser establecidas por el usuario final.

Obtención y preparación de la muestra

Emplear suero como muestra. Se recomienda medir la actividad del complemento inmediatamente después de haber separado el suero. Si es preciso, almacenar la muestra a – 70°C o temperatura inferior. El ácido ascórbico, la bilirrubina, la hemoglobina y la turbidez de las muestras lipémicas no tienen un efecto significativo en los resultados.

Materiales suministrados

Ver el apartado „Reactivos"

Materiales necesarios pero no suministrados

Analizador automatizado
Calibrador CH50 (Código No. 997-43801)
Control de Complemento (Código No. 991-43701)

Preparación de los reactivos

Reactivo 1: (R1)
Emplear los Liposomas (R1) tal como se suministran. La solución es estable hasta la fecha de caducidad.
Reactivo 2: (R2) + (R2a)
Reconstituir un envase (para 20 ml) del Substrato (R2) con un envase (20 ml) de Diluyente (R2a) para preparar la Solución Substrato. La Solución Substrato es estable 40 días a 2-10 °C.
Calibrador: CAL
Añadir cuidadosamente 0,5 ml de agua destilada o desionizada para disolver el contenido de cada calibrador. Una vez reconstituido, mantener la solución en hielo y usarla en un período de 8 horas.

innovación tecnológica para laboratorio Rafer

Autokit CH50

***In vitro* automatizado basado en liposomas**

Para la determinación de del complemento total en suero humano

Resultados

Los resultados se calculan automáticamente y se imprimen en unidades de concentración.

Calibración

El ensayo CH50 se calibra con una curva que representa la absorbancia frente a la concentración. Se recomienda realizar al menos una calibración semanal.

Control de calidad

Se recomienda un programa de control de calidad para todos los laboratorios clínicos. Para monitorizar el funcionamiento de la técnica, se recomienda el análisis de materiales de control en rangos normales y patológicos. Los valores obtenidos deben estar entre los márgenes indicados por el fabricante. Si el material de control no tiene valores establecidos, el laboratorio deberá realizar el número de análisis necesario para obtener un valor central y un rango aceptable.

Limitaciones del procedimiento

El rango de medición del Autokit CH50 es de 10-60 U/ml. Cuando los valores de CH50 exceden 60 U/ml, diluir la muestra 1 + 1 con solución salina, repetir el ensayo y multiplicar por 2 el resultado.

Valores esperados

Suero: 23 – 46 U/ml.[7]

Ya que los valores esperados están afectados por la edad, sexo, dieta, localización geográfica y otros factores, cada laboratorio debe establecer su propio rango.

Prestaciones analíticas

Exactitud (WAKO-30R)

No.	Esperado (U/ml)	Observado (U/ml)	Recuperación (%)
1	27,1	31,0	114,4
2	36,5	40,0	109,6
3	47,3	47,0	99,4
4	54,6	53,5	98,0

Precisión (WAKO-30R)

Prueba preliminar de precisión. Precisión intra-ensayo

Proceso #	Muestra #	Replicados	Media (U/ml)	SD	CV (%)
1	1	21	49,5	0,5	1,10
1	2	21	25,9	0,3	1,35
2	1	21	46,2	0,5	1,14
2	2	21	27,9	0,3	1,05

Precisión total

Los datos se recogieron de acuerdo con la Guía NCCLS

Nivel de Concentración	# de días de ensayo	Media (U/ml)	SD	CV (%)	S_{wr}	S_T
High	21	48,3	1,57	3,2	18,9	22,1
Low	21	26,9	1,54	5,7	16,6	16,7

Sensibilidad: el nivel mínimo detectable de CH50 se ha estimado en 10 U/ml.

Especificidad (WAKO-30R)

Estudio de adición

Acido Ascórbico (mg/dl)	Nada	10	20	30	40	50
CH50 (U/ml)	36,0	36,0	36,0	35,0	35,5	35,5

Bilirrubina (mg/dl)	Nada	8	16	24	32	40
CH50 (U/ml)	35,0	36,0	36,0	36,0	37,0	37,0

Hemoglobina (mg/dl)	None	100	200	300	400	500
CH50 (U/ml)	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	39,5

Referencias

1. Schur PH : Complement studies of sera and other biologic fluids. Hum Palhol 1983 ; 14 : 338-42.
2. Mayer MM : Complement and complement fixation. In : Kabat EA, Mayer MM , eds. Experimental immunochemistry, 2nd ed. Springfield, IL: Charles C Thomas. 1967 ; 133-240.
3. Kitamura H , Inai S , Nagaki K : A simple procedure for the titration of total hemolytic complement activity. Jpn J Clin Chem 1983 ; 12 : 143-7.
4. Kinsky SC : Antibody-complement interaction with lipid model membranes. Biochim Biophys Acta 1972 ; 265 : 1-23.
5. Akots G , Braman JC , Broeze RJ , Bowden DW : Rapid, homogeneous phase, liposome-based assays for total complement activity. Complement 1984 ; 1 : 125-33.
6. Bowden DW , Rising M , Akots G , Myles A , Broeze RJ : Homogeneous liposome-based assay for total complement activity in serum. Clin Chem 1986 ; 32 : 275-8.
7. Yamamoto S , Kubotsu K , Kida M , Kondo K , Matsuura S , Uchiyama S , Yonekawa 0 , Kanno T : Clin Chem 1995 ; 41 : 586-90.

Presentaciones

Código No.	Producto	Presentación
995-40801	Autokit CH50	R1: 2 x 20 ml R2: 1 x para 20 ml R2a: 1 x 20 ml
997-43801	CH50 Calibrator	CAL: 5 Conc. x 0,5 ml
991-43701	Complement Control	H: 10 x 0,5 ml L: 10 x 0,5 ml

innovación tecnológica para laboratorio Rafer